

*На правах рукописи*



---

Сиваев Андрей Александрович

**Функциональные полистирольные и  
полиглицидилметакрилатные микросферы, получение,  
модификация и свойства для создания диагностических тест-  
систем**

02.00.06 – высокомолекулярные соединения

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре химии и технологии высокомолекулярных соединений им. С. С. Медведева Института тонких химических технологий федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА - Российский технологический университет»

**Научный руководитель:** **Грицкова Инесса Александровна**  
доктор химических наук, профессор, профессор кафедры химии и технологии высокомолекулярных соединений им. С. С. Медведева Института тонких химических технологий федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА - Российский технологический университет»

**Официальные оппоненты:** **Штильман Михаил Исаакович**  
доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой «Биоматериалы» РХТУ им. Д.И. Менделеева

**Царькова Марина Сергеевна**  
доктор химических наук, профессор, профессор Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА им. К.И. Скрябина

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г. в \_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 212.131.07 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА - Российский технологический университет» (Институт тонких химических технологий) по адресу: 119571, г. Москва, пр-т Вернадского, д. 86, ауд. Т-410.

С авторефератом диссертации можно ознакомиться на интернет-сайтах ВАК РФ <http://vak.ed.gov.ru> и <https://www.mirea.ru/>.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА - Российский технологический университет» (Институт тонких химических технологий) по адресу: 119571, г. Москва, пр-т Вернадского, д. 86, и на интернет-сайте <https://www.mirea.ru/>.

Автореферат диссертации разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь заседания  
диссертационного совета Д 212.131.07  
доктор химических наук, профессор  Симакова Г. А.

*В руководстве работы принимал участие доктор медицинских наук, проф. Гусев С.А.*

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ <sup>1</sup>**

### **Актуальность темы**

В настоящее время полимерные микросферы широко используются в различных областях науки и техники, и часто приходят на замену материалам природного происхождения.

Например, в медицине полимерные микросферы с иммобилизованными на их поверхности биолигандами предлагаются вместо эритроцитов для создания гемагглютинационных диагностических тест-систем, основанных на протекании реакции антиген-антитело. К основным преимуществам таких тест-систем можно отнести простоту получения и длительные сроки хранения. Недостаток – более низкая чувствительность тест-систем в сравнении с эритроцитарными диагностикумами, поэтому актуальны исследования, направленные на повышение их чувствительности.

Значительное влияние на чувствительность и специфичность диагностикумов оказывает количество молекул биолиганда, иммобилизованного на поверхность полимерных микросфер. Расчеты плотности их расположения на поверхности микросфер не всегда совпадают с экспериментальными данными. Это может быть обусловлено тем, что при иммобилизации на поверхность полимерных микросфер происходит изменение конформации биолиганда и, как следствие этого, изменение его аффинности по отношению к молекулам определяемого вещества. Кроме того, возможно, что некоторая часть молекул биолиганда проникает внутрь частиц полимерного носителя, что может значительно занижать реальную плотность его расположения на поверхности микросфер, и тем самым снижать чувствительность реакции латексной агглютинации.

В этом случае могут играть роль такие свойства полимерных микросфер, как их пористость, т.е. размеры пор как на поверхности, так и в объеме полимерных частиц. В данном исследовании впервые предлагается метод изучения пористости полимерных микросфер методом конфокальной микроскопии с применением в качестве меток флуоресцентных производных сахаридов. В основе их получения впервые будет использована реакция Майяра между аминокетонами, расположенными на поверхности и в объеме полимерных микросфер, и альдегидными группами декстранов разной молекулярной массы.

Чувствительность при визуализации РЛА можно также повысить путем окрашивания полимерных частиц. Самым простым вариантом окрашивания частиц является введение в мономерную фазу гидрофобных красителей при проведении гетерофазной полимеризации. В данной работе будут рассмотрены новые подходы к окрашиванию полимерных суспензий.

---

<sup>1</sup> Работа была выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. (Соглашение о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий № 075-15-2019-1273 от 14.06.2019 (внутренний № 14.577.21.0273), уникальный идентификатор RFMEFI57717X0273).

Полимерные микросферы, предлагаемые для использования в биотехнологии и в иммунохимических исследованиях, должны иметь узкое распределение по размерам и строго сферическую форму. При синтезе полимерных микросфер с такими свойствами методом дисперсионной полимеризации в первую очередь необходимо контролировать начальную стадию полимеризации, на которой формируются частицы. В работе рассмотрено влияние температурного режима процесса синтеза на начальной стадии на формирование частиц и их распределение по размерам для выявления условий полимеризации, при которых образуются полимерные суспензии с узким распределением частиц по размерам.

Очень важным показателем, влияющим на протекание РЛА, и в первую очередь на чувствительность реакции, является образование агрегатов частиц, заметно влияющих на формирование осадка в процессе реакции агглютинации. В работе предложены пути повышения устойчивости частиц в процессе их синтеза, за счет проведения дополнительной затравочной полимеризации стирола при его низкой концентрации в присутствии поливинилового спирта.

Другое актуальное и важное направление основано на создании модифицированных гепарином полимерных микросфер, где последние выступают в качестве своеобразных сорбентов нейтрофильных внеклеточных ловушек. Это особые сетевидные структуры, выбрасываемые во внеклеточное пространство нейтрофильными лейкоцитами при активации, способные электростатически взаимодействовать с гепарином, иммобилизованным на поверхности частиц.

При некоторых заболеваниях (сахарный диабет, ревматоидный артрит, онкологические заболевания) происходит образование большого количества нейтрофильных внеклеточных ловушек в потоке крови, что приводит к развитию тяжелых осложнений. В связи с этим чрезвычайно актуальной является проблема определения их количества и методов удаления их из крови. В данной работе предлагается эти проблемы решить с применением полимерных микросфер.

**Цель работы** - синтез полистирольных и полиглицидилметакрилатных микросфер с узким распределением по размерам и их модификация (хлорметилирование, аминирование, иммобилизация декстрана) для создания новых высокочувствительных диагностических тест-систем, тест-систем для оценки активации нейтрофильных лейкоцитов, для количественного определения нейтрофильных внеклеточных ловушек в крови и повышения чувствительности реакции латексной агглютинации.

Для достижения поставленной цели необходимо:

1. Оценить роль регулирования температуры реакционной среды на начальной стадии дисперсионной полимеризации стирола и глицидилметакрилата в формировании распределения полимерных частиц по размерам и их среднего диаметра;
2. Синтезировать полистирольные микросферы с диаметрами 0,2-0,5 мкм с узким распределением по размерам методом гетерофазной полимеризации в микрокаплях мономера;
3. Изучить набухание мономера в затравочных частицах разного размера и определить оптимальное массовое соотношение ГМА/ЭГДМА для проведения затравочной полимеризации;
4. Разработать способ контролируемой модификации полистирольных микросфер методом хлорметилирования;
5. Провести аминирование хлорметилованных полистирольных и полиглицидилметакрилатных микросфер первичными аминами, этилендиамином и гексаметилендиамином, и оценить влияние этой модификации на физико-химические свойства полимерных микросфер;
6. Изучить метод определения пористости в полимерных микросферах с помощью флуоресцентных производных, продуктов реакции Майяра, между аминогруппами полимерных частиц и альдегидными группами декстранов разной молекулярной массы;
7. Повысить чувствительность реакции латексной агглютинации за счет использования полимерных суспензий, не содержащих агрегаты полимерных микросфер;
8. Синтезировать методом затравочной полимеризации полистирольные микросферы с диаметром 100-140 мкм, провести их хлорметилирование и аминирование для использования в качестве сорбента для извлечения нейтрофильных внеклеточных ловушек из крови и тест-систем для оценки активации нейтрофильных лейкоцитов.

#### **Научная новизна**

-впервые разработана методология получения полистирольных и полиглицидилметакрилатных микросфер с различными диаметрами, модифицированных путем хлорметилирования, аминирования и иммобилизации декстрана, которые рекомендованы для создания высокочувствительных диагностических тест-систем (титр 1:6400), для оценки активации нейтрофильных лейкоцитов и в качестве сорбентов для извлечения нейтрофильных внеклеточных ловушек из крови;

-установлено, что на формирование узкого распределения частиц по размерам и на кинетику роста диаметра частиц влияет регулирование температуры на начальной стадии дисперсионной полимеризации.

-впервые показано влияние природы аминирующего агента (этилендиамина и гексаметилендиамина) и среды аминирования (воды, н-пропанола) на физико-химические свойства поверхности частиц (гидрофильность поверхности,  $\xi$ -потенциал, скорость седиментации, содержание функциональных (амино)групп и установлено, что полимерные частицы, модифицированные ЭДА, во всех случаях седиментируют с образованием рыхлого осадка из-за гидратации аминогрупп и групп, находящихся в поверхностном и приповерхностном слоях. При аминировании полимерных микросфер гексаметилендиамином уменьшается концентрация первичных аминогрупп в поверхностном слое полимерных микросфер, увеличивается угол смачивания и при седиментации частиц образуется плотный осадок;

-впервые разработан метод определения диаметров пор в полимерных микросферах в диапазоне от 1 нм до нескольких десятков нанометров с помощью флуоресцентных производных, продуктов реакции Майяра, между аминогруппами полимерных микросфер и альдегидными группами декстранов разной молекулярной массы. Показано, что эта реакция протекает во всем объеме полимерных микросфер, а диаметр пор в полимерных микросферах составляет величину порядка 30 нм;

-разработан метод синтеза полимерных микросфер с диаметрами 100 мкм и узким распределением по размерам затравочной полимеризацией стирола с четвертичными аминогруппами на поверхности, проведена их модификация хлорметилированием и аминированием, изучено их взаимодействие с компонентами крови и разработана тест-система для оценки активации нейтрофильных лейкоцитов;

-разработана диагностическая тест-система для количественного определения нейтрофильных внеклеточных ловушек в крови с использованием модифицированных полисахаридом полистирол-метакриловых микросфер с диаметром 0,25 мкм;

-в разработанных методах создания новых диагностических тест-систем на основе реакции пассивной агглютинации ПМС сохранены все этапы ранее принятой технологии для получения эритроцитарных диагностикумов, т.е. не требуется обучения персонала и замены оборудования, и изменения технологических процессов;

-выбран способ окрашивания полимерных микросфер азофенолметакрилатом как наиболее эффективный и обеспечивающий стабильную окраску частиц;

-предложены и испытаны пути повышения чувствительности при визуализации РЛА: окрашивание полимерных суспензий, дополнительная стадия затравочной

полимеризации, приводящая к изменению ГЛБ поверхности частиц и отсутствию агрегатов частиц;

### **Практическая значимость работы**

Созданы рецептуры синтеза и модификации микросфер различной полимерной природы со свойствами, позволяющими использовать их в биотехнологии (латекс-агглютинация, оценка активации нейтрофилов и количественного определения нейтрофильных внеклеточных ловушек). Разработанные диагностические тест-системы с использованием модифицированных полимерных микросфер в качестве носителей биолигандов были апробированы с положительным результатом для определения уровня антител к дифтерийному анатоксину в сыворотках крови человека, а также в качестве сорбентов нейтрофильных внеклеточных ловушек в крови и для оценки активации нейтрофильных лейкоцитов.

### **Автор защищает:**

-Усовершенствование методологии синтеза полимерных микросфер, позволяющее исключить агрегацию частиц в полимерных суспензиях и увеличить чувствительность тест-системы, улучшить визуализацию результатов постановки теста;

-Метод окрашивания полимерных микросфер сополимеризацией стирола и глицидилметакрилата с мономерами, содержащими хромофорные группы;

-Методологию синтеза монодисперсных полимерных микросфер с диаметрами в интервале 100 - 140 мкм и их модификацию;

-Рецептуры синтеза полимерных микросфер для использования их в качестве сорбентов нейтрофильных лейкоцитов;

-Создание способа количественной оценки содержания нейтрофильных внеклеточных ловушек с использованием полимерных микросфер в качестве сорбентов;

**Личное участие** автора являлось основополагающим на всех этапах работы и состояло в постановке цели исследования, разработке экспериментальных и теоретических подходов при выполнении экспериментов и обобщении полученных результатов.

### **Апробация работы**

Результаты исследований и основные положения диссертации докладывались и обсуждались на Международной конференции-конкурсе "Инновации в области химии и технологии высокомолекулярных соединений" ("РМС-2019") (27-28 мая 2019 г. – Воронеж, 2019), XXIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2018», (Москва, Россия, 10 – 14 апреля 2018 г).

## **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе 4 статьи по теме диссертации опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК.

## **Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 172 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждений, выводов и списка литературы, включающего 140 источников. Диссертация содержит 63 рисунка и 27 таблиц.

## **Содержание работы**

Во **Введении** обоснована актуальность темы и практическая значимость диссертационной работы, сформулированы цели, задачи исследования и научная новизна.

**Глава 1** Литературный обзор посвящен анализу работ по синтезу полимерных суспензий для создания диагностических тест-систем и их свойствам.

**Глава 2** В экспериментальной части приведены характеристики веществ, используемых в работе, и методы исследования

## **Глава 3 РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

**3.1.1. Дисперсионная полимеризация стирола в среде спирт/вода при регулировании температуры на начальной стадии процесса.**

Современной и актуальной проблемой в области практической медицины является замена эритроцитов на полимерные микросферы и создание на их основе диагностических тест-систем, работающих по принципу реакции пассивной латексной агглютинации (РПЛА).

Диаметр частиц и распределение их по размерам - одни из самых важных параметров дисперсионной полимеризации, которые в значительной степени зависят от природы и концентрации мономера, стабилизатора, инициатора и температуры.

В этом разделе работы представлены данные по изучению начальной стадии дисперсионной полимеризации стирола и глицидилметакрилата. Исследовано влияние концентрации мономера и температуры на диаметр частиц и их распределение по размерам с подробным анализом изменения дисперсности реакционной системы на начальной стадии в процессе формирования частиц. Эти данные необходимы для выбора условий получения полимерных дисперсий с диаметром частиц 1,5-3 мкм и узким распределением по размерам для использования в качестве затравочных при затравочной полимеризации стирола и глицидилметакрилата.

Исследования были начаты с изучения влияния концентрации мономера на диаметр частиц и их РЧР. Концентрацию мономера изменяли в диапазоне 20 - 40% объемных, вне данного диапазона проведение полимеризации нецелесообразно по

нескольким причинам. Так, при концентрации мономера меньше 20% при проведении полимеризации в метаноле и этаноле, образующиеся частицы имели размер около 1 мкм и не удовлетворяли требованиям, предъявляемым к микросферам для их использования в качестве носителей биополимеров.

При концентрации мономера больше 40% при проведении полимеризации мономера в метаноле и этаноле наблюдалась вторичная нуклеация частиц и широкое распределение частиц по размерам.

Было установлено, что в интервале 20 - 40% объемных концентраций мономера можно получить полимерные суспензии в необходимом интервале размеров (от 2 до 5 мкм). Весь процесс полимеризации делили на определенное количество стадий, отличающихся температурой. Было обнаружено, что, изменяя количество стадий, температуру полимеризации и время выдерживания реакционной системы при каждой температуре, можно в значительной степени влиять на диаметр полимерных микросфер и их распределение по размерам.

Такой способ проведения начальной стадии процесса исключает возможность преждевременного формирования достаточного количества олигомерных радикалов на стадии, предшествующей моменту нуклеации частиц. Это позволяет максимально нивелировать возмущения, вносимые иницирующими радикалами в протекание стадии образования полимерных цепей и их роста с момента иницирования до потери ими растворимости и выпадения в дисперсионную среду.

Дисперсионную полимеризацию проводили при двух различных температурных режимах изменения температуры, которые различались скоростью подъема температуры в реакционной системе в самом начале полимеризации. Так, в первой серии экспериментов температуру от 50<sup>0</sup> до 67<sup>0</sup>С поднимали за 25 минут, а во второй от 50<sup>0</sup> до 70<sup>0</sup>С за 20 минут.

### **3.1.2. Затравочная сополимеризация стирола с дивинилбензолом.**

При затравочной сополимеризации стирола с дивинилбензолом целевой размер сополимерных микросфер должен составлять величину порядка 4,0-4,5 мкм, то есть требуемый размер частиц должен быть больше затравочных частиц примерно в 2 раза.

Таким образом, для получения частиц размером 4,5 мкм необходимо взять мономерную смесь в количестве, пятикратно превышающем массу затравочных частиц.  
 $x = n^3 - 1 = (4,5/2,5)^3 - 1 \approx 5$ .

Предварительно были приготовлены 1-я и 2-я водные фазы, которые представляли из себя 1%-ный водный раствор ПВС с добавлением 0,1% бихромата калия. Необходимость разделения водной фазы на две порции объяснялось следующими причинами: при набухании частиц нет необходимости в большом разбавлении

реакционной системы; достаточно объема раствора стабилизатора, примерно равного объёму мономера. При этом набухание протекает быстро, образование агрегатов частиц или их коалесценция минимизируется.

При проведении непосредственно полимеризации реакционной системе необходимо большее разбавление (минимум 2,5 части воды на 1 часть мономера), поскольку в ином случае произойдёт агрегация частиц.

Стабилизатор (поливиниловый спирт) необходим для предотвращения коалесценции частиц, бихромат калия - для предотвращения эмульсионной полимеризации мономера. Методологию проведения затравочной полимеризации важно соблюдать для того, чтобы исключить формирование новых частиц и обеспечить узкое распределение частиц по размерам. Мономерную фазу получали смешением стирола, дивинилбензола (4% мономерной смеси), инициатора – перекиси бензоила (рецептура синтеза приведена в таблице 3.1.2.1).

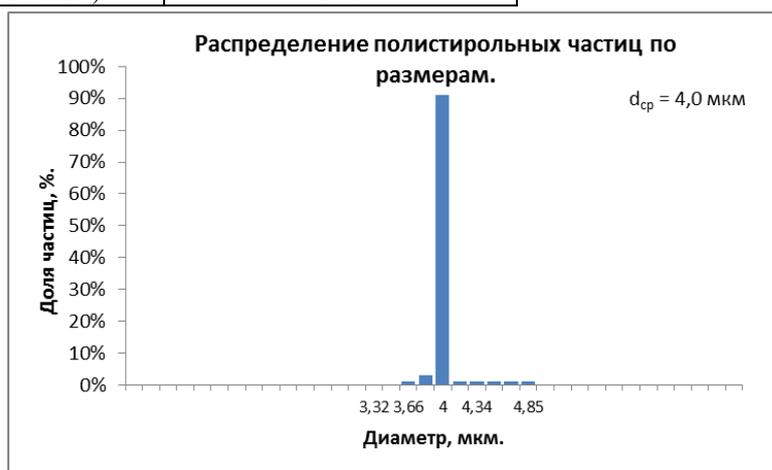
Микрофотография полимерных микросфер и их распределение по размерам приведены на рис. 3.1.2.1. Видно, что полученные частицы имеют узкое РЧР и средний диаметр 4 мкм.

**Таблица 3.1.2.1. Рецепттура затравочной сополимеризации.**

Вещество	Навеска
Стирол	95 г
Дивинилбензол	5 г
Перекись бензоила	1,5 г
1-я водная фаза	150 мл
2-я водная фаза	350 мл
Полистирольные частицы (затравочные)	20 г



**А.**



**Б.**

**Рис. 3.1.2.1. Электронная микрофотография (А) и гистограмма распределения по размерам (Б) сополимерных хлорметилированных полистирол-дивинилбензольных частиц (ПСТ-ДВБ-ХМ)**

### 3.1.3. Модификация полистирол-дивинилбензольных частиц.

Определяющей характеристикой полимерных микросфер при выборе для использования их в качестве носителей белка являются их физико-химические свойства поверхности, позволяющие провести иммобилизацию биомолекул на поверхность полимерных микросфер без изменения его конформации.

Основным требованием, предъявляемым к полимерным микросферам, является наличие на их поверхности функциональных групп. При выборе природы функциональных групп предпочтение чаще всего отдают карбоксильным и аминогруппам, которые способны образовывать ковалентную связь с функциональными группами биомолекул после относительно простой реакции активации.

Наиболее простым методом получения полимерных микросфер с аминогруппами на поверхности является аминирование полимерных частиц диаминами.

Для осуществления химического взаимодействия между диаминами и полимерами, такими как полистирол, необходимо предварительно провести функционализацию полимера, например, хлорметилирование, т.е. получая полистирол с хлорметильными группами в *o*- и *p*-положении (ПСТ-ДВБ-ХМ), для того, чтобы в дальнейшем провести аминирование частиц полимерной суспензии (табл. 3.1.3.1).

**Таблица 3.1.3.1.** Рецепт хлорметилирования полимерных микросфер.

Вещество	Навеска
Полимерные частицы	100 г
Монохлордиметилэфир	600 мл
Хлорид олова (IV)	60 г
Этанол	300 мл

Согласно данным элементного анализа, содержание хлора в частицах составляет 20%, что означает глубокое протекание реакции – молярное содержание хлорметильных групп составляет около 90% в расчете на количество звеньев стирола в полимере.

ПСТ-ДВБ-ХМ микросферы аминировали первичными диаминами – гексаметилендиамином (ГМДА) и этилендиамином (ЭДА).

Модификацию полимерных микросфер ГМДА проводили в *n*-пропаноле и в воде. Физико-химические свойства сополимерных модифицированных микросфер приведены в табл. 3.1.3.2.

Видно, что угол смачивания исходных ПСТ-ДВБ и аминированных ГМДА микросфер равен  $96^\circ$  и  $70^\circ$ , соответственно, т.е. их поверхность гидрофобна.

Сополимерные микросферы, аминированные ЭДА, характеризовались гидрофильной поверхностью (угол смачивания- $12^\circ$ ). Наблюдаемые различия в свойствах полимерных микросфер можно объяснить участием двух аминогрупп ГМДА во взаимодействии с хлорметилновыми группами полимерных микросфер из-за большей,

чем у ЭДА, подвижности углеводородного радикала ГМДА. Результатом такого взаимодействия является снижение поверхностной концентрации свободных аминогрупп на поверхности частиц, модифицированных ГМДА. В случае ЭДА, вероятность взаимодействия второй аминогруппы с хлорметиленовыми группами полимера мала, и первичные аминогруппы полимерных цепей сосредоточены на поверхности сополимерных микросфер.

**Таблица 3.1.3.2.** Физико-химические свойства ПСТ-ДВБ-ХМ аминированных микросфер.

Тип частиц	Средний диаметр частиц, мкм	Значение $\xi$ -потенциала, мВ	Значение угла смачивания, градусы, $\pm 1^{\circ}$	Скорость седиментации, мм/час	Плотность осадка частиц после седиментации	N, %
ПСТ-4%ДВБ	4.0 $\pm$ 0.1	-10.3 $\pm$ 0.1	96.1	7.0 $\pm$ 0.3	плотный осадок	-
ПСТ-4%ДВБ-ХМ-NH <sub>2</sub> (ЭДА)	4.0 $\pm$ 0.1	+3.3 $\pm$ 0.1	12.0	4.1 $\pm$ 0.3	плотный осадок	8.88 $\pm$ 0.05
ПСТ-4%ДВБ-ХМ-NH <sub>2</sub> (ГМДА) аминирование в н-пропаноле	4.0 $\pm$ 0.1	-10.5 $\pm$ 0.1	40.2	15.0 $\pm$ 0.4	плотный осадок	3.94 $\pm$ 0.05
ПСТ-4%ДВБ-ХМ-NH <sub>2</sub> (ГМДА) аминирование в воде	4.0 $\pm$ 0.1	-10.8 $\pm$ 0.1	70.3	7.5 $\pm$ 0.5	плотный осадок	0.81 $\pm$ 0.05

Наличие аминогрупп на поверхности и в приповерхностном слое частиц, с одной стороны, обеспечивает их ковалентное связывание с функциональными группами биополимера, а с другой их количество должно быть лимитировано из-за образования рыхлых осадков в процессе седиментации при реакции латексной агглютинации вследствие высокой степени их гидратации.

Для исключения образования агрегатов в полимерной суспензии проводили еще одну затравочную полимеризацию, используя в качестве затравочных частиц хлорметилированные аминированные частицы, синтезированные по методике, описанной ранее.

Таким образом, были получены сополимерные частицы, содержащие функциональные NH<sub>2</sub>-группы, имеющие узкое распределение частиц по размерам, диаметром 4,5 мкм, полимерная суспензия не содержала агрегатов частиц.

### 3.1.4. Сополимерные стирол-дивинилбензолные microsферы в качестве носителей биолигандов.

Все синтезированные полистирол-дивинилбензолные хлорметилованные аминированные microsферы были использованы для получения диагностических тест систем с высокой чувствительностью.

### 3.1.5. Синтез полимерных microsфер со средним диаметром частиц 140 мкм.

Полистирольные microsферы с диаметром 140 мкм с аминогруппами на поверхности были синтезированы многостадийной затравочной полимеризацией.

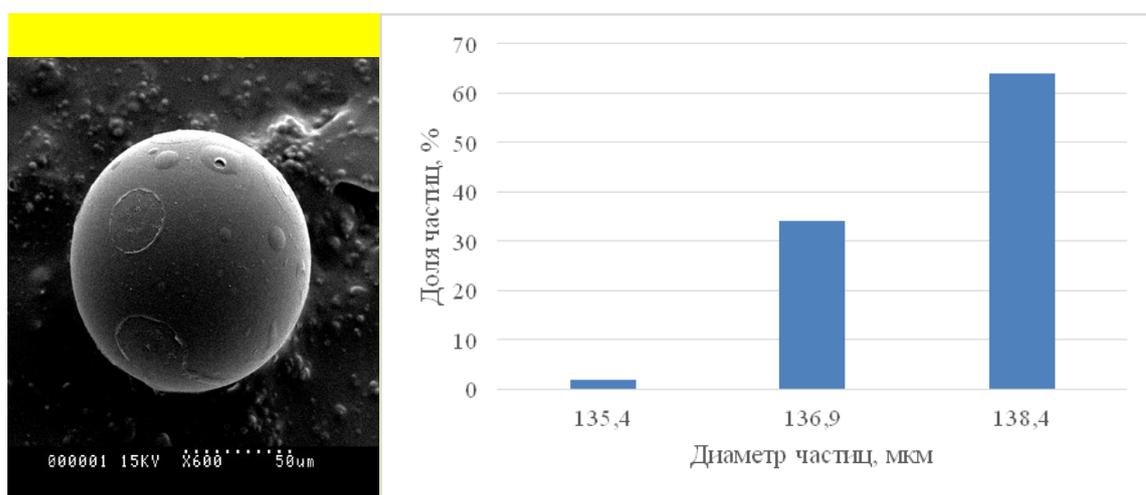
Для достижения заданного размера (140 мкм) необходимо было провести 6 стадий затравочной полимеризации, используя синтезированные на каждой стадии microsферы как затравочные для последующей полимеризации.

На последней стадии затравочной полимеризации в состав мономерной фазы добавляли необходимое количество ДВБ, и после экстракции линейного полимера в конечной полимерной суспензии получали частицы необходимого диаметра и сшивки (рис.3.1.5.1).

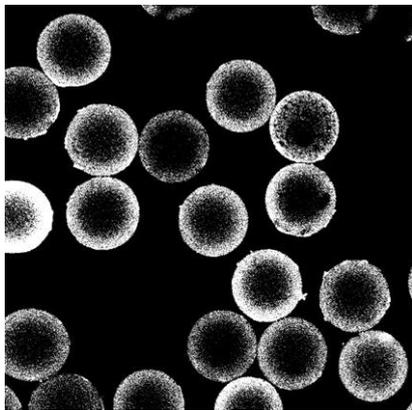
Хлорметилирование и аминирование ЭДА полимерных microsфер проводили по методике, использованной при модификации ПСТ-ДВБ частиц.

Наличие функциональных групп в полимерных microsферах было подтверждено результатами реакции Майяра между аминогруппами полимера и альдегидными группами глюкозы и декстранов разной молекулярной массы.

На рисунке 3.1.5.2. приведены результаты конфокальной микроскопии, которые подтвердили наличие пористости поверхности полимерных microsфер. Был оценен размер пор, который составляет 30 нм.



**Рисунок 3.1.5.1.** Микрофотография и распределение по размерам (Ст-4%ДВБ) хлорметилованных аминированных microsфер.



**Рисунок 3.1.5.2.** - Результаты конфокальной микроскопии после проведения реакции Майяра между полимерными микросферами и декстраном 60000 Да.

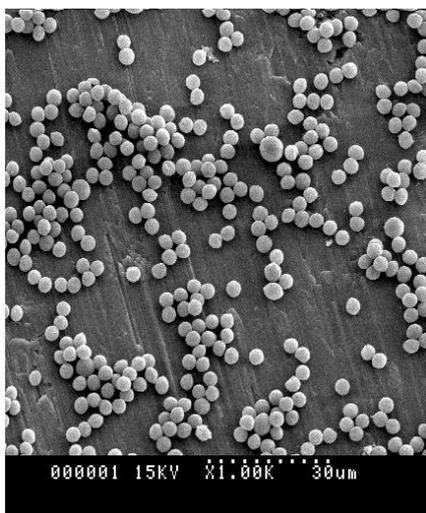
### **3.2. Синтез сополимерных полиглицидилметакрилатных(ПГМА)-полиэтиленгликольдиметакрилатных (ПЭГДМА) суспензий и их модификация.**

Для применения полимерных микросфер в качестве носителей биолигандов в РЛА, их диаметр должен быть около 5 мкм для стирола и около 3,5 мкм для ГМА. Синтез полимерных микросфер с таким диаметром состоял из двух самостоятельных этапов. Первый-это синтез полимерных суспензий с диаметром 2-3 мкм дисперсионной полимеризацией и второй – затравочной полимеризацией полимера с использованием полученных микросфер в качестве затравочных частиц. Рецептúra проведения дисперсионной сополимеризации глицидилметакрилата и этиленгликольдиметакрилата приведена в таблице 3.2.1.

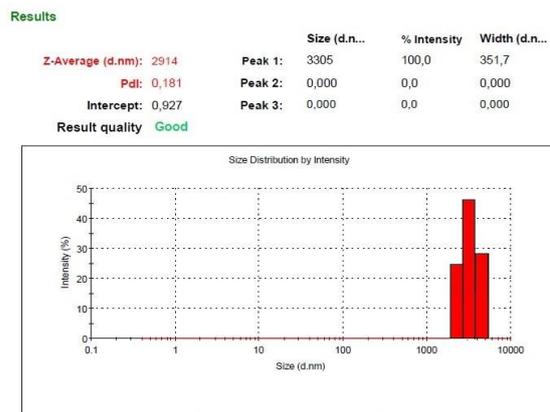
Методика проведения полимеризации аналогична описанной выше для полимеризации стирола, но, из-за более высокой реакционной способности ГМА, несколько отличается по температурному режиму. Процесс до полной конверсии мономера проводили 2 часа при 67<sup>0</sup>С, затем 1 час при 70<sup>0</sup>С. Используя данный рецепт, были получены затравочные пГМА монодисперсные микросферы диаметром 2 мкм.

**Таблица 3.2.1.** Рецептúra синтеза полиглицидилметакрилатной суспензии.

Вещество	Навеска
ГМА+ЭГДМА	100 г
Перекись бензоила	1 г
1-я водная фаза	150 мл
2-я водная фаза	350 мл
пГМА частицы (затравка)	22 г



А.



Б.

**Рис. 3.2.1.** Электронная микрофотография (А) и гистограмма распределения по размерам (Б) ПГМА микросфер диаметром 3 мкм.

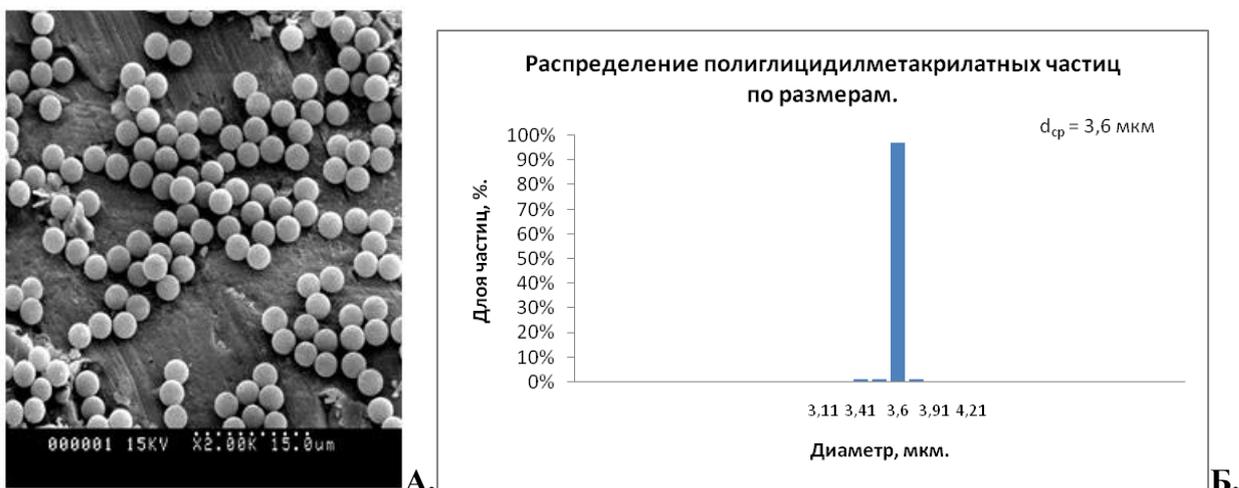
Следующую стадию затравочной сополимеризации проводили по рецептуре, представленной ниже: (табл.3.2.2).

**Таблица 3.2.2.** Рецептура синтеза ПГМА-ЭГДМА суспензии методом затравочной полимеризации.

Вещество	Навеска
ГМА+ЭГДМА	100 г
Перекись бензоила	1 г
1-я водная фаза	150 мл
2-я водная фаза	350 мл
пГМА частицы (затравка)	22 г

Микрофотография сополимерных п(ГМА-ЭГДМА) частиц со средним диаметром 3,5 мкм и их распределение по размерам приведены на рис.3.2.2.

Напомним, что аминирование полученных частиц основывалось на способности эпоксигрупп молекул ГМА взаимодействовать с аминами. В качестве аминирующих агентов использовали этилендиамин (ЭДА) и гексаметилендиамин (ГМДА). При раскрытии оксиранового цикла молекулы ГМА образовывались гидроксигруппа и первичная аминогруппа. Вторичный амин, получаемый при взаимодействии ЭДА с эпоксидной группой, неактивен в реакциях с биологически активными веществами. Данный метод позволяет модифицировать практически все глицидильные группы ПГМА.



**Рис. 3.2.2.** Электронная микрофотография (А) и гистограмма распределения частиц по размерам (Б) частиц, полученных затравочной полимеризацией.

Полученные микросферы должны содержать достаточное количество аминогрупп для иммобилизации белков и получения высокочувствительных тест-систем, однако избыточная гидрофильность мешает протеканию реакции латексной агглютинации.

Противоречие между содержанием аминогрупп в частицах и их агрегативной устойчивостью было решено проведением дополнительной затравочной полимеризации на уже модифицированных частицах в присутствии поливинилового спирта и разного содержания сшивающего агента. Полимерные микросферы не образуют агрегатов, при этом содержат необходимое число аминогрупп. В этом случае мономерная фаза представляла собой смесь мономеров, состоящую из 75% ММА + 25%ЭГДМА. Была получена устойчивая суспензия частиц, не содержащая агрегатов, что позволило создать на их основе высокочувствительную тест-систему. Эти результаты показали, что таким образом можно контролировать количество функциональных групп в полимере, а также гидрофильно-липофильный баланс, подбирая соотношение функциональный мономер/инертный сшиватель. Таким образом, были получены частицы с диаметром 3.5-мкм с разной степенью сшивки: от 3% до 90%.

Количество аминогрупп, содержащихся в полимерных микросферах, определяли по содержанию азота в сополимере методом элементного анализа. (табл.3.2.3).

Видно, что аминирование ПГМА-ЭГДМА микросфер протекает эффективно, причём с увеличением содержания ЭГДМА содержание азота в сополимере снижается, видимо, из-за увеличения степени сшивания полимерных цепей.

Так, сополимерные суспензии, содержащие 75% массовых ЭГДМА и 25% массовых ГМА, содержали 0,76% азота масс., а сополимерные суспензии, содержащие 25% массовых ЭГДМА и 75% массовых ГМА, 3.12% масс. При содержании в полимерных микросферах азота выше 4% масс. поверхность полимерных микросфер становится

гидрофильной и при их седиментации не образуются плотные осадки (табл. 3.2.4). Физико-химические свойства аминированных сополимерных микросфер приведены в табл. 3.2.4 и 3.2.5.

**Таблица 3.2.3.** Данные элементного анализа ПГМА-ЭГДМА микросфер, аминированных этилендиамином.

Тип частиц	N, %	Относительное содержание аминогрупп в сополимере, %
ПГМА-5%ЭГДМА-NH <sub>2</sub> (ЭДА)	15.75±0.05	81
ПГМА-25%ЭГДМА-NH <sub>2</sub> (ЭДА)	10.82±0.05	60
ПГМА-50%ЭГДМА-NH <sub>2</sub> (ЭДА)	5.72±0.05	40
ПГМА-75%ЭГДМА-NH <sub>2</sub> (ЭДА)	3.05±0.05	20
ПГМА-5%ЭГДМА-NH <sub>2</sub> (ГМДА)-водные	4.86±0.05	24
ПГМА-5%ЭГДМА-NH <sub>2</sub> (ГМДА)-в н-пропаноле	9.30±0.05	48
ПГМА-25%ЭГДМА-NH <sub>2</sub> (ГМДА)-водные	3.12±0.05	21
ПГМА-25%ЭГДМА-NH <sub>2</sub> (ГМДА)-в н-пропаноле	4.00±0.05	30
ПГМА-50%ЭГДМА-NH <sub>2</sub> (ГМДА)-водные	1.65±0.05	10
ПГМА-50%ЭГДМА-NH <sub>2</sub> (ГМДА)-в н-пропаноле	3.61±0.05	24
ПГМА-75%ЭГДМА-NH <sub>2</sub> (ГМДА)-водные	0.76±0.05	5
ПГМА-75%ЭГДМА-NH <sub>2</sub> (ГМДА)-в н-пропаноле	1.49±0.05	10

**Таблица 3.2.4.** Физико-химические свойства ПГМА-ЭГДМА микросфер.

Тип частиц	Диаметр частиц, мкм	ξ-потенциал, мВ	Угол смачивания <sup>0</sup>	Скорость седиментации, мм/час	Плотность осадка частиц после седиментации
ПГМА-5%ЭГДМА-NH <sub>2</sub> (ЭДА)	4.5±0.1	+20.1±0.1	<5	6.4±0.3	рыхлый осадок
ПГМА-25%ЭГДМА-NH <sub>2</sub> (ЭДА)	4.1±0.1	+19.3±0.1	<5	5.2±0.4	рыхлый осадок
ПГМА-50%ЭГДМА-NH <sub>2</sub> (ЭДА)	4.1±0.1	+17.1±0.1	<5	4.8±0.4	рыхлый осадок
ПГМА-75%ЭГДМА-NH <sub>2</sub> (ЭДА)	4.1±0.1	+16.7±0.1	<5	4.6±0.5	рыхлый осадок

Полимерные частицы, модифицированные ЭДА, во всех случаях седиментируют с образованием рыхлого осадка и характеризуются гидрофильной поверхностью, что, видимо, связано с гидратацией поверхностных групп и групп, находящихся в

приповерхностном слое. В результате контакта гидратированных полимерных микросфер в процессе их седиментации формируется осадок, характеризующийся невысокими значениями энергии взаимодействия между частицами. В результате происходит частичная пептизация осадка, он становится легкоподвижным и можно визуально фиксировать легкость его взмучивания.

При аминировании полимерных микросфер гексаметилендиамином (табл. 3.2.5) распределение аминогрупп между приповерхностным слоем полимерной частицы и близлежащим объемом изменяется. С увеличением длины углеводородного радикала конформационная подвижность молекул диамина повышается и возрастает вероятность взаимодействия двух его аминогрупп с эпоксигруппами глицидилметакрилата. Это приводит к уменьшению концентрации первичных аминогрупп в поверхностном слое полимерных микросфер, его гидрофобизации (увеличению угла смачивания). При седиментации частиц образуется плотный осадок.

**Таблица 3.2.5.** Физико-химические свойства аминированных микросфер, полученных при разном содержании ЭГДМА в смеси мономеров.

Тип частиц	Диаметр частиц, мкм	$\xi$ -потенциал, мВ	Угол смачивания <sup>0</sup>	Скорость седиментации, мм/час	Плотность осадка частиц после седиментации
ПГМА-5%ЭГДМА-NH <sub>2</sub> (ГМДА)-водные	3.5±0.1	+1.6±0.1	3.0±1	6.1±0.3	рыхлый осадок
ПГМА-5%ЭГДМА-NH <sub>2</sub> (ГМДА)-в н-пропанол	3.5±0.1	+2.0±0.1	<5	6.0±0.3	рыхлый осадок
ПГМА-25%ЭГДМА-NH <sub>2</sub> (ГМДА)-водные	3.0±0.1	+2.9±0.1	20.0±1	6.7±0.3	плотный осадок
ПГМА-25%ЭГДМА-NH <sub>2</sub> (ГМДА)-в н-пропанол	3.5±0.1	+22.5±0.1	31.2±1	6.5±0.4	плотный осадок
ПГМА-50%ЭГДМА-NH <sub>2</sub> (ГМДА)-водные	3.5±0.1	+1.7±0.1	25.1±1	6.0±0.4	плотный осадок
ПГМА-50%ЭГДМА-NH <sub>2</sub> (ГМДА)-в н-пропанол	3.5±0.1	+15.6±0.1	47.2±1	6.2±0.5	плотный осадок
ПГМА-75%ЭГДМА-NH <sub>2</sub> (ГМДА)-водные	3.5±0.1	+1.0±0.1	22.0±1	5.9±0.5	плотный осадок
ПГМА-75%ЭГДМА-NH <sub>2</sub> (ГМДА)-в н-пропанол	3.5±0.1	+2.9±0.1	30.4±1	6.3±0.5	плотный осадок

Видно также, что гидрофильность поверхности полимерных микросфер зависит от содержания ЭГДМА в сополимере, что, вероятно, связано с уменьшением числа эпоксигрупп, способных к реакции взаимодействия с диаминами. При содержании ЭГДМА в сополимере, равном 5% масс., при синтезе частиц в водной и спиртовой среде

угол смачивания менее  $5^{\circ}$ , поверхность полимерных микросфер гидрофильна и при их седиментации образуется рыхлый осадок.

Данные элементного анализа (табл. 3.2.3) показывают, что содержание азота в ПГМА-ЭГДМА микросферах, аминированных ГМДА в спирте, выше, чем в полимерных микросферах, аминированных в водной среде.

Все синтезированные полимерные микросферы были использованы для получения диагностических тест систем для определения антител к дифтерийному анатоксину. Дифтерийный анатоксин был иммобилизован на поверхность полимерных микросфер через карбодиимид и на поверхность микросфер, содержащую ковалентно связанные с ней декстраны разной молекулярной массы. Следует напомнить, что реакция Майяра была использована для ковалентного связывания декстрана с полимером, в результате взаимодействия концевых альдегидных групп декстрана с аминогруппами полимера.

Разработанный метод создания таких диагностических тест-систем, работающих на основе реакции пассивной агглютинации ПМС, включает все этапы ранее принятой технологии получения эритроцитарных диагностикумов, т.е. не требуется обучения персонала, замены оборудования и изменения технологических процессов;

Полимерные микросферы, аминированные в среде ЭДА, оказались неустойчивыми в фосфатно-солевом буфере и их не использовали в дальнейших исследованиях.

Проведенные исследования показали, что наиболее перспективными для замены эритроцитов в РЛА являются сополимерные ГМА-ЭГДМА микросферы, синтезированные при равном массовом содержании мономера, аминированные гексаметилендиамином, и содержащие в поверхностном слое декстран, ковалентно связанный с поверхностью частиц.

### **3.3. Исследование структуры полимерных микросфер.**

При разработке диагностических тест-систем важным является вопрос о количестве лиганда, иммобилизованного на поверхность полимерной микросферы. Этот показатель оказывает значительное влияние на чувствительность и специфичность диагностикумов.

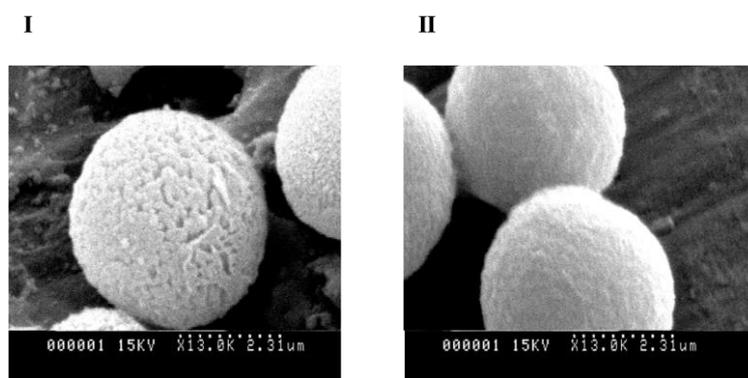
Реальная плотность расположения лиганда на поверхности полимерных микросфер может отличаться от теоретически рассчитанной из-за того, что некоторая часть молекул лиганда проникает вглубь частиц носителя. Поэтому представляется обоснованным в качестве одной из характеристик полимерных микросфер, применяемых для создания диагностических тест систем, рассматривать наличие пористости в объеме частиц и на их поверхности.

Изучение пористости полимерных частиц проводили методом конфокальной микроскопии с применением в качестве меток флуоресцентных производных декстранов и глюкозы. Для изучения размеров пор полимерных частиц впервые была использована реакция Майяра, которая протекает между аминокетонами полимера и альдегидными группами сахаридов а также метод ионного травления ионизированным воздухом. Преимущества этого метода состоят в быстроте выполнения эксперимента и его простоте. Этот метод не требует большого количества анализируемого материала и на основании данных протекания реакции можно судить о структуре полимерных частиц.

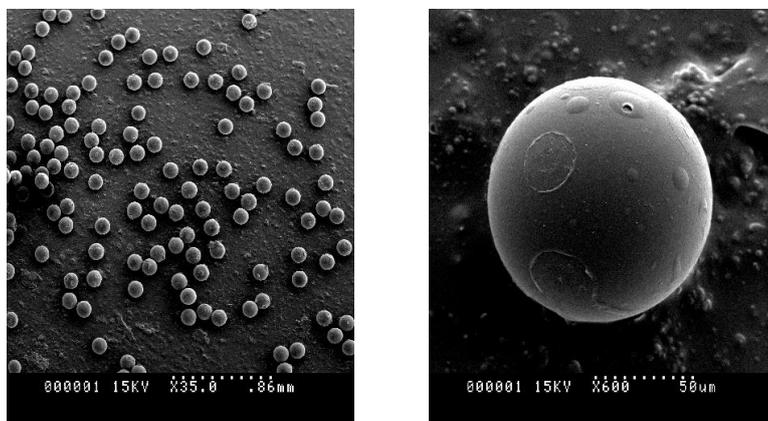
Изучение размеров пор полимерных частиц проводили на примере аминоксодержащих ПСТ-ДВБ-ХМ и ПГМА-ЭГДМА микросфер, микрофотографии которых представлены на рисунке 3.3.1 и на примере полистирольных частиц с аминокетонами на поверхности со средним диаметром 140 мкм, микрофотографии которых приведены на рисунке 3.3.2.

Для определения размера пор использовали реакцию Майяра между аминокетонами полимерных микросфер и альдегидными группами декстранов разной молекулярной массы (15000 Да, 60000 Да, 500000 Да).

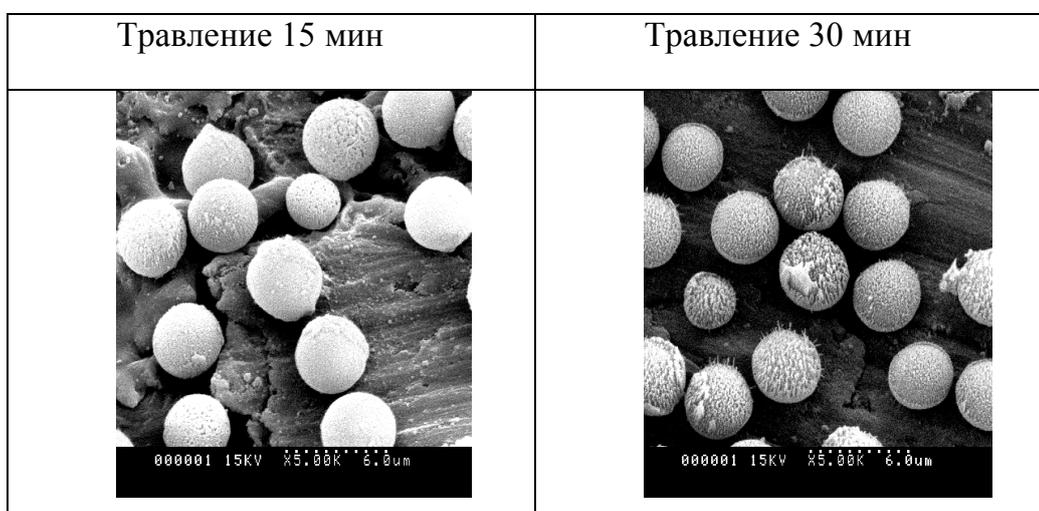
Полученные результаты (рис. 3.3.3.) показывают, что декстраны разной молекулярной массы проникают внутрь частиц на глубину приблизительно 45 мкм, значит, это надо будет учитывать при расчетах плотности посадки лигандов.



**Рис. 3.3.1.** Микрофотографии полимерных микросфер, использованных для изучения структуры частиц.



**Рис. 3.3.2.** Микрофотографии полимерных микросфер, использованных для изучения структуры частиц.



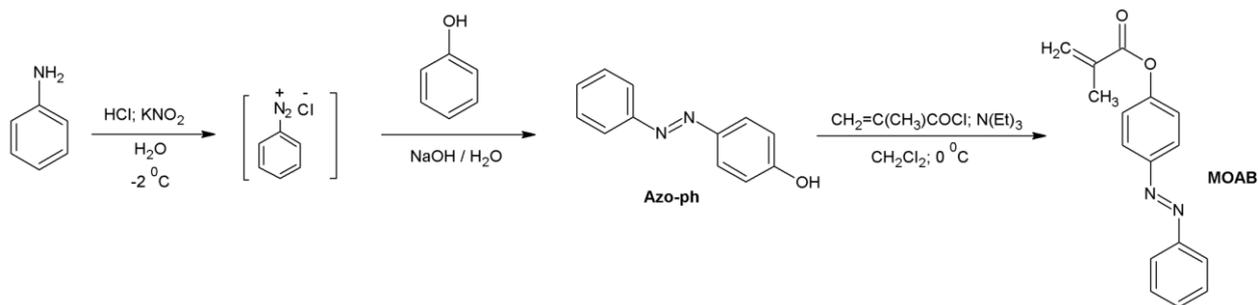
**Рис. 3.3.3.** Хлорметилированные аминированные полистирольные микросферы со средним диаметром 5 мкм, подвергнутые ионному травлению.

### 3.4. Окрашивание полимерных микросфер

Разработка новых подходов к окрашиванию полимерных микросфер является актуальной задачей и в настоящее время. Самым перспективным направлением работ является развитие методов сополимеризации красителей с мономерами, применяемыми при синтезе полимерных суспензий методом гетерофазной полимеризации. Однако, осуществить данный способ на практике весьма затруднительно, ввиду низкой реакционной способности мономеров-красителей.

Для оценки возможности сополимеризации азокрасителей различного строения с MMA была изучена реакция сополимеризации модельного соединения – метакрилоксиазобензола, МОАВ, с MMA.

Для синтеза данного вещества была предложена следующая схема (схема 3.4.1).



### Схема 3.4.1. Синтез МОАВ.

Было показано, что для создания насыщенной окраски частиц достаточно совсем небольшого количества метакрилоксиазофенола – порядка 15% в пересчёте на массу затравочных частиц; при этом цветность полученных частиц практически не отличается от таковой у исходного красящего вещества. Большого количества мономера также не требуется – достаточно лишь небольшого его количества, в котором растворится краситель, при этом мономерная смесь равномерно распределится по микросферам.

Смесь мономеров (ММА, ЭГДМА, азофенолметакрилат, ПБ) добавляли к суспензии затравочных частиц. После этого при перемешивании по каплям добавляли около 1 мл этанола, при этом происходила диффузия мономеров в микросферы. Далее смесь выдерживали при перемешивании около получаса, добавляли 2-ю водную фазу, нагревали до 80 С. Полимеризацию проводили 5 часов. Полученную суспензию промывали водой на фильтре Шотта.

Следует отметить, что образец был проверен на устойчивость цвета к растворителям. При промывке ацетоном и дихлорметаном полимерных частиц падение цветности не произошло.

### 3.5. Создание тест-систем для определения количества нейтрофильных внеклеточных ловушек.

Известно, что кровь человека и животных содержит нейтрофильные лейкоциты, которые играют важную роль в поддержании врожденного иммунитета. При воспалении они первыми приходят в очаг, где захватывают и устраняют микроорганизмы. Одним из способов ликвидации микроорганизмов является образование активированными нейтрофилами сетеподобных структур - нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ).

В системном кровотоке НВЛ могут механически нарушать кровообращение в тканях и органах и способствовать развитию и осложнению протекания различных патологических состояний.

Таким образом, с одной стороны, НВЛ функционируют как эффективный антимикробный барьер, с другой стороны, их избыток ведет к развитию воспалительных

процессов и к гемодинамическим расстройствам в случае неполноценности противодействующих регуляторных механизмов. По этой причине появилась необходимость поиска способов обнаружения НВЛ и подсчета их количества.

Наиболее приемлемым, быстрым, низким по себестоимости и легкодоступным может быть метод, в основе которого будут использованы полистирольные микросферы в качестве сорбента.

Для обнаружения и оценки количества НВЛ было предложено использовать полистирол-метакриловые микросферы с диаметром 0,25 мкм. Размер микросфер был выбран из условия, что частицы не должны оседать при действии небольших центробежных ускорений, то есть быть диаметром меньше 0,5 мкм - границы седиментационной устойчивости полимерных частиц. Микросферы диаметром меньше 0,25 мкм не могут быть использованы по техническим причинам: сложность манипулирования, трудности при просмотре в микроскоп.

Способ получения полимерного сорбента состоял в следующем. На поверхность микросфер, содержащую карбоксильные группы, через стадию аминирования ковалентно иммобилизовали кислый аминополисахарид - гепарин. Гепарин, благодаря своему строению, а именно содержанию отрицательно заряженных сульфогрупп, должен электростатически взаимодействовать с положительно заряженными белками-гистонами в составе ловушек. В таком случае диагностиком, полимерная микросфера-гепарин, будет сорбироваться на поверхность ловушек (рисунок 3.5.1), оседать за счет повышенной массы и систему диагностиком-НВЛ можно отделить и измерить количество ловушек.

В результате проведенных исследований была разработана диагностическая тест-система на основе полистирол-метакриловых микросфер диаметром 0,25 мкм для количественного определения нейтрофильных внеклеточных ловушек. Полимерные микросферы синтезированы микросуспензионной полимеризацией из микрокапель мономера и характеризуются узким распределением частиц по размерам  $PdI=1,000$ , и диаметром  $D_n = 0,2214$  мкм. Разработан метод ковалентной иммобилизации гепарина на поверхность микросфер, и доказано его присутствие по изменению окраски толуидинового синего. Обнаружено, что при взаимодействии тест-системы с кровью разрушения эритроцитов (гемолиз) не наблюдается. На поверхности ловушки были обнаружены микросферы тест-системы.



**Рисунок 3.5.1.** - Нейтрофильная внеклеточная ловушка с сорбированными на поверхность полимерными микросферами диаметром 0,25 мкм.

Кроме того, для оценки количества НВЛ были использовали полимерные микросферы диаметром 140 мкм с аминогруппами на поверхности. Микросферы синтезировали в четыре стадии: дисперсионная полимеризация стирола, многостадийная затравочная полимеризация, хлорметилирование и аминирование этилендиамином. Поверхность модифицировали гепарином. При изучении взаимодействия диагностикума с кровью наблюдали сорбцию НВЛ на поверхность полимерных микросфер.

В процессе изучения и апробирования тест-систем было отмечено явление дополнительной активации клеток, в результате чего появилась необходимость разработать диагностикум для оценки активации нейтрофилов при действии механических факторов.

Для количественной оценки активации нейтрофилов при механическом воздействии была разработана другая диагностическая тест-система. Использовали полимерные микросферы с диаметром 100 мкм с четвертичными аммониевыми группами на поверхности, которые аналогично синтезировали в четыре стадии по методике, используемой при синтезе частиц с диаметром 140 мкм. На стадии аминирования использовали триметиламин. Показано, что микросферы характеризуются следующими параметрами:  $PdI = 1,02$ ,  $D_n = 104,9$ ,  $D_w = 106,8$ . Был разработан метод иммобилизации мембран эритроцитов на поверхность полимерных микросфер, для предотвращения осаждения ловушек на поверхность и методы окраски мембраны. Доказательством наличия мембраны эритроцитов на поверхности являются фотографии теней, окрашенные 5(6) изотиоцианатом и 3-метоксибензантроном. Было изучено взаимодействие тест-системы с кровью и показано, что в результате механического воздействия нейтрофилы активируются.

## **ВЫВОДЫ:**

1. Синтезированы полимерные микросферы (стирол-дивинилбензолные, глицидилметакрилат-этиленгликольдиметакрилатные) разного диаметра с узким распределением по размерам, определены условия их модификации (хлорметилирование, аминирование, иммобилизация декстрана), выбраны для использования в качестве носителей биолигандов полиглицидилметакрилат-этиленгликольдиметакрилатные микросферы, полученные при равном массовом соотношении мономеров. Показано, что они характеризуются оптимальными физико-химическими свойствами, что позволяет при их использовании получить высокочувствительные диагностические тест-системы на антитела к дифтерийному анатоксину (титр 1:6400)

2. Изучение начальной стадии дисперсионной полимеризации стирола и глицидилметакрилата выявило важную роль температурного режима на стадии образования полимерно-мономерных частиц и их распределения по размерам. Предложены режимы подъема температуры на начальной стадии полимеризации, позволяющие получать полимерные микросферы с диаметрами 2,5-5 мкм и узким распределением по размерам

3. Методом электронной сканирующей микроскопии и конфокальной микроскопии изучена пористость полимерных микросфер и размеры пор с применением впервые меток флуоресцентных производных сахаридов, полученных реакцией Майяра между аминогруппами полимерных микросфер и сахарами. Показано, что реакция Майяра протекает во всем объеме частиц. Средние размеры пор составляют 30 нм.

4. Разработан и описан синтез полистирольных микросфер с диаметром 140 мкм и узким распределением по размерам методом многостадийной затравочной полимеризации, определены условия их модификации. Полимерные микросферы модифицированы путем хлорметилирования и аминирования и рекомендованы в качестве диагностических тестов и для количественного определения активации нейтрофильных лейкоцитов.

5. Синтезированы полимерные микросферы с диаметрами 0,25 мкм и узким распределением по размерам методом полимеризации в микрокаплях мономера. Полимерные микросферы модифицированы полисахаридами и использованы для количественного определения нейтрофильных внеклеточных ловушек в крови.

6. Предложены пути повышения чувствительности тест-систем при визуализации реакции латексной агглютинации путем использования полимерных суспензий, не содержащих агрегатов полимерных микросфер, и их окрашивания, а также путем

дополнительной стадии проведения затравочной полимеризации мономера в присутствии поливинилового спирта.

#### **Список печатных работ:**

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК:

1. **Санджиева А.В.** Пути повышения специфичности реакции латекс-агглютинации / Санджиева А.В., Бахтина А.В., **Сиваев А.А.**, Басырева Л.Ю., Гусев С.А., Грицкова И.А. // Тонкие Химические технологии – 2016 Т.11 №2 С.17-22.
2. **Бахтина А.В.** Синтез аминоксодержащих полимерных микросфер затравочной сополимеризацией для применения в биотехнологии/Бахтина А.В., **Сиваев А.А.**, Левачёв С.М., Гусев С.А., Лобанова Н.А., Лазов М.А., Грицкова И.А. // Тонкие химические технологии.-2017.-Т.12.-№4.-с.75-84.
3. **Сиваев А.А.** Дисперсионная полимеризация стирола и глицидилметакрилата в среде спирт-вода при регулировании температуры на начальной стадии процесса / **Сиваев А.А.**, Лукашевич А.Д., Бахтина А.В., Лобанова Н.А., Левачев С.М., Гусев С.А. Грицкова И.А. // Пластические массы – 2017 -№7-8 –с.1-7.
4. **Грицкова И.А.** Полимерные микросферы для замены биологических носителей в тест-системах, работающих по принципу реакции латексной агглютинации / И. А. Грицкова, А. А. Сиваев, С. А. Гусев, С. М. Левачев, Н. А. Лобанова, А. В. Андреева, С. Н. Чвалун // Известия Академии наук. Серия химическая – 2019-№11 – с.1-8.

#### Тезисы докладов:

1. **А.А. Сиваев**, С.А. Гусев, И.А. Грицкова, Л.Ю. Басырева, С.Н. Чвалун / Полимерные микросферы для использования в качестве носителей библигандов // Материалы второго всероссийского этапа VII международной конференции-конкурса «Инновации в области химии и технологии высокомолекулярных соединений» («РМС-2019») и первого научно-технического форума «Полимеры-материалы будущего». Воронеж, 27-28 мая 2019 года - 118 с.-с.96-97.
2. П.А. Чичева, К.С. Левченко, К.А. Чудов, П.С. Шмелин, И.А. Грицкова, **А.А. Сиваев** / Модификация полимерных микросфер электрохромными соединениями // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2018» / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. [Электронный ресурс] — М.: МАКС Пресс, 2018.